

A/

1/3,AB/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2003 Thomson Derwent. All rts. reserv.

008690705

WPI Acc No: 1991-194725/ 199127

XRAM Acc No: C91-084237

**Increasing aminoacid esp. lysine prodn. in Corynebacterium - or
Brevibacterium, contg. recombinant DNA with sequences for both
dihydro-dipicolinate synthase and de-regulated aspartate kinase**

Patent Assignee: FORSCHUNGSZENTRUM JUELICH GMBH (KERJ); FORSCHUNGSZENT
JUELICH GMBH (KERJ)

Inventor: CREMER J; EGDELING L; SAHM H

Number of Countries: 007 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 435132	A	19910703	EP 90124557	A	19901218	199127 B
DE 3943117	A	19910704	DE 3943117	A	19891227	199128
EP 435132	B1	19940817	EP 90124557	A	19901218	199432
DE 59006837	G	19940922	DE 506837	A	19901218	199437
			EP 90124557	A	19901218	

Priority Applications (No Type Date): DE 3943117 A 19891227

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 435132	A			

Designated States (Regional): BE DE FR GB IT NL SE

EP 435132	B1 G	11	C12N-015/09
-----------	------	----	-------------

Designated States (Regional): BE DE FR GB IT NL SE

DE 59006837	G		C12N-015/09	Based on patent EP 435132
-------------	---	--	-------------	---------------------------

Abstract (Basic): EP 435132 A

Prodn. of amino acid, esp. L-lysine (I), comprises growing a microorganism of the genera Corynebacterium or Brevibacterium which contains recombinant DNA consisting of vector DNA and a sequence for prodn. of proteins with dapA (dihydrodipicolinate synthase) activity, in a nutrient medium, and then recovery of amino acid. The new feature is that the DNA additionally contains a sequence encoding protein with lysC (deregulated aspartate kinase) activity.

Also new are (1) recombinant DNA contg. dapA and lysC sequence plus vector DNA and (2) (I)-producing Corynebacterium and Brevibacterium contg. such DNA.

The DNA coding sequences are esp. derived from a (I)-producing strain, partic. a mutant derived from C. glutamicum ATCC 13032 with reduced feed-back inhibition of aspartate kinase.

USE/ADVANTAGE - Transformants contg. the new recombinant DNA have improved amino acid, esp. (I), secretion rates. They have 15-fold higher dapA and aspartate kinase activities (the rate-controlling factors in (I) biosynthesis). (12pp Dwg.No.0/3)

Abstract (Equivalent): EP 435132 B

Process for preparing amino acid, in particular L-lysine, by cultivating a microorganism of the genus Corynebacterium or Brevibacterium, which harbours a recombinant DNA consisting of vector DNA and of a DNA sequence coding for the production of proteins having dapA activity, in a nutrient medium and isolating the amino acid from the culture medium, characterised in that the recombinant DNA additionally contains a DNA sequence coding for the production of proteins having lysC activity.

Dwg.0/3



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Offic européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 435 132 A1**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑲ Anmeldenummer: **90124557.1**

⑳ Anmeldetag: **18.12.90**

⑤① Int. Cl.⁵: **C12N 15/09, C12P 13/08,
C07H 21/04, C12N 1/21,
/(C12P13/08,C12R1:15),
(C12P13/08,C12R1:13)**

Der Anmelder hat eine Erklärung nach Regel 28 (4) EPÜ (Herausgabe einer Probe nur an einen Sachverständigen) eingereicht.
Eingangsnummer(n) der Hinterlegung(en): **DSM 5714, 5715.**

Die Mikroorganismen sind bei Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter den Nummern **DSM 5714 und 5715** hinterlegt worden.

③① Priorität: **27.12.89 DE 3943117**

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
03.07.91 Patentblatt 91/27

⑥④ Benannte Vertragsstaaten:
BE DE FR GB IT NL SE

⑦① Anmelder: **Forschungszentrum Jülich GmbH
Postfach 1913, Wilhelm-Johnen-Strasse
W-5170 Jülich(DE)**

⑦② Erfinder: **Cremer, Josef, Dr.
Höhenstrasse 65
W-5165 Hürtgenwald 2(DE)
Erfinder: Eggeling, Lothar, Dr.
Eisenkamp 6
W-5170 Jülich(DE)
Erfinder: Sahm, Hermann, Prof.
Wendelinusstrasse 71
W-5170 Jülich(DE)**

⑥④ Verfahren zur fermentativen Herstellung von Aminosäure, insbesondere **L-Lysin**, dafür geeignete Mikroorganismen und rekombinante **DNA**.

⑥⑦ Gemäß der Erfindung wird eine in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* replizierbare rekombinante DNA aus Vektor-DNA und für die Produktion von Proteinen mit *dapA*-Aktivität und *lysC*-Aktivität kodierenden DNA-Sequenzen vorgesehen. Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, die eine solche rekombinante DNA enthalten, sind für die Gewinnung von Aminosäuren, insbesondere **L-Lysin**, besonders geeignet. Die DNA-Sequenzen stammen insbesondere aus **L-Lysin** produzierenden Stämmen der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, vorzugsweise aus einer durch Mutagenese von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 erhaltenen Mutante mit verminderter Feed back Hemmung der Aspartatkinase wie aus dem Stamm **DSM 5714**. Ein besonders geeigneter transformierter Mikroorganismus wird durch den *Corynebacterium glutamicum* Stamm **DSM 5715** gebildet.

EP 0 435 132 A1

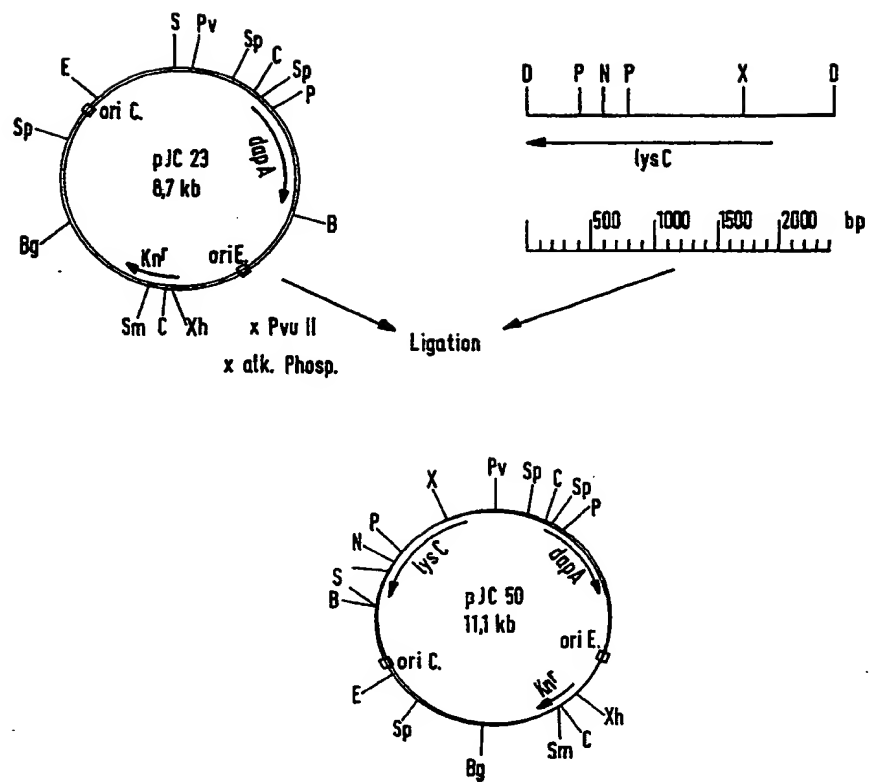


FIG. 1

VERFAHREN ZUR FERMENTATIVEN HERSTELLUNG VON AMINOSÄURE, INSBESONDERE L-LYSIN, DAFÜR GEEIGNETE MIKROORGANISMEN UND REKOMBINANTE DNA

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung von Aminosäure, insbesondere von L-Lysin, durch Züchten eines Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, der eine rekombinante DNA aus Vektor-DNA und für die Produktion von Proteinen mit *dapA*-Aktivität kodierende DNA-Sequenz enthält, in einem Nährmedium und Gewinnung der Aminosäure aus dem Kulturmedium, und sie umfaßt dafür geeignete Mikroorganismen und rekombinante DNA.

Corynebacterium glutamicum und verwandte Gattungen wie z. B. *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium flavum* sind als Aminosäuren bildende Mikroorganismen bekannt. Um deren Produktivität zu erhöhen, wurden ungerichtete Mutationen mit physikalischen und chemischen Mitteln durchgeführt.

Neben dieser klassischen Methode zur Produktionssteigerung wurden auch bereits Vektorsysteme entwickelt, die die Anwendung rekombinanter DNA-Techniken für Mikroorganismen der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* ermöglichen und mit denen durch Amplifikation von Biosynthesegenen die Ausscheidungsmenge von Aminosäuren erhöht werden kann.

So ist aus der EP-A2-0 219 027 die Klonierung eines DNA-Fragmentes aus *Corynebacterium* bekannt, das einen *Escherichia coli* Stamm mit defektem Gen für die Aspartatsemialdehyddehydrogenase (*asd*) oder die Aspartat-Aminotransferase (AAT) komplementiert. Das klonierte Fragment führt nach Transformation eines Lysin ausscheidenden *Corynebacterium* Stammes zu gesteigerter Lysinbildung.

In der EP-A1-0 143 195 wird die Klonierung eines DNA-Fragmentes und dessen positive Auswirkung auf die Lysinbildung beschrieben, das Phosphoenolpyruvatcarboxylase defekte Mutanten komplementiert.

Als ein weiteres DNA-Fragment wird in der EP-A1-0 197 335 ein die Dihydrodipicolinatsynthase (*dapA*) komplementierendes Gen angegeben, das ebenfalls zu gesteigerter Lysinbildung führt und ggf. zusammen mit für Tetrahydropicolinsäure-Succinylase kodierendem Gen vorgesehen wird.

In der De-Patentanmeldung P 39 08 201.6 wird ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin beschrieben, bei dem eine in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* replizierende rekombinante DNA aus Vektor-DNA und für *asd* und/oder *LysC* (deregulierte Aspartatkinase) kodierenden DNA-Sequenzen für die Transformation der Mikroorganismen vorgesehen wird.

In der DE-Patentanmeldung P 38 23 451.3 wird schließlich eine in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* replizierbare rekombinante DNA aus Vektor-DNA und *asd* Gen und/oder *dapA* Gen angegeben, die zur Transformation von Mikroorganismen zur Gewinnung von Aminosäuren der Aspartat-Familie, insbesondere von L-Lysin dienen soll.

Diese unterschiedlichen gentechnologischen Verfahren haben bislang noch nicht zu einer allseits akzeptierten Aminosäureproduktion geführt.

Ziel der Erfindung ist daher ein Verfahren zur fermentativen Aminosäureproduktion, das zu einer verbesserten Aminosäure-, insbesondere L-Lysinausscheidungsrate führt.

Das zu diesem Zweck entwickelte erfindungsgemäße Verfahren der eingangs genannten Art ist dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA zusätzlich eine für die Produktion von Proteinen mit *LysC*-Aktivität kodierende DNA-Sequenz enthält.

Weitere Besonderheiten der Erfindung gehen aus den Patentansprüchen hervor.

Als Donorstämme können alle (bevorzugt L-Lysin produzierenden) Bakterien der Gattung *Brevibacterium* und *Corynebacterium* dienen, die die entsprechenden Gene enthalten, insbesondere aber *Corynebacterium glutamicum* MH-20, das durch Mutagenese von *Corynebacterium* ATCC 13032 mit Nitronitrosoguanidin entwickelt wurde, und deregulierte Aspartatkinase (*LysC*) enthält. Dieser Stamm ist unter der Nummer DSM 5714 hinterlegt.

Die chromosomale DNA wird aus dem Donor auf bekannte Weise extrahiert und mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Nach der Konstruktion der rekombinanten DNA durch Einführung chromosomaler DNA-Fragmente in einen Vektor erfolgt die Transformation des Mikroorganismus mit dem so gewonnenen Plasmid, erfindungsgemäß beispielsweise mit pJC50, dessen

Restriktionskarte in Figur 1 dargestellt ist, und das in dem Stamm *Corynebacterium glutamicum* MH 20-22B unter der Nummer DSM 5715 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen gemäß dem Budapester Abkommen hinterlegt wurde.

Ein bevorzugtes Vektorsystem stellt pZ1 dar (EP-A1-0318663) oder dessen Derivat pJC1 (Cremer et al., J. General Microbiol. 134 (1988) 3221-3229). Verwendbar sind aber auch die aus der EP-A-93 611 bekannten zusammengesetzten Plasmide, soweit sie in *Corynebakterien* oder *Brevibakterien* replizieren, insbesondere pAJ655, pAJ611, pAJ440, pAJ1844 und pAJ3148, aber auch pCG11 oder pCE54 (EP-A 0 233 581).

Das konstruierte Plasmid enthält die Kombination der klonierten Gene *dapA* und *lysC*. Transformanten, die dieses Plasmid aufweisen, enthalten eine bezüglich der feed back Inhibition durch L-Threonin und L-Lysin erhöhte deregulierte Aspartatkinase Aktivität, sowie gleichzeitig erhöhte Dihydrodipicolinatsynthase Aktivität. Enzymmessungen haben ergeben, daß die Aktivität der Aspartat Kinase in solchen Transformanten etwa 15 fach und die der Dihydrodipicolinat Synthase ebenfalls etwa 15 fach erhöht ist.

Die bei dieser Kombination der Gene erreichten Enzymaktivitäten gewährleisten sowohl eine effiziente Einschleusung von Aspartat in die Lysinbiosynthesesequenz (durch die deregulierte erhöhte Aspartatkinase Aktivität), als auch eine Überwindung der in der Dihydrodipicolinatsynthase bestehenden Limitation innerhalb der Biosynthesesequenz.

Es ergibt sich somit eine wesentliche Verbesserung dadurch, daß gleichzeitig die den Substratfluß kontrollierenden Enzyme der Lysinbiosynthesesequenz überexprimiert werden, wobei durch die Kombination eine L-Lysinausscheidung bewirkt oder eine vorhandene verbessert wird.

Die Herstellung von L-Lysin produzierenden Stämmen, die bevorzugt angewandt werden, ist in der US-PS 4 275 157 sowie im J. Gen. Appl. Microbiol. 15 (1969) 267-87 beschrieben.

Die Erzeugung von Mutanten mit verminderter Feed back Hemmung der Aspartatkinase kann, wie im J. Biochem. (Tokyo) Bd. 68 (1970) Seiten 701-710 oder in Agr. Biol. Chem. (Tokyo) 48 (1984) Seiten 3091-3098 beschrieben, erfolgen.

Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Beispielen näher beschrieben:

Beispiel 1: Herstellung rekombinanter Stämme

A) Klonierung eines DNA-Fragmentes von *Corynebacterium glutamicum*, das für Dihydrodipicolinatsynthaseaktivität kodiert (*dapA*).

Gesamt-DNA wurde aus *C. glutamicum* ATCC 13032 - wie bei Chater et al. (Curr. Topics Microb. Immunol. 96 (1982) 69) beschrieben - isoliert und partiell mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* verdaut. Mit der DNA wurden Cosmide in *Escherichia coli* ED8767 mit dem Cosmidvektor pHC79 entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Boehringer Mannheim, 6800 Mannheim 31) konstruiert. Diese Cosmide wurden wie bei Maniatis et al. beschrieben isoliert (T. Maniatis et al., "Molecular Cloning", A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Harbour), und benutzt, den im Dihydrodipicolinatsynthasegen *dapA* defekten *E. coli* Stamm RDA8 zu komplementieren. Ein Cosmid wurde isoliert und durch Subklonierung in *E. coli* RDA8 nach den bekannten Verfahren ein 2,7 kb *SalI/BamHI* DNA Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde in die multiple cloning site von pJC1 ligiert und so das Plasmid pJC23 (Figur 2) erhalten. Dieses in *E. coli* konstruierte Plasmid wurde durch Sphäroplastentransformation (Thierbach et al., Appl Microbiol Biot 29 - (1988) 356) nach *C. glutamicum* transferiert.

B) Klonierung eines DNA Fragmentes, das für deregulierte Aspartatkinase Aktivität kodiert.

Chromosomale DNA wurde aus *C. glutamicum* MH 20 isoliert und Cosmide wie in Beispiel 1 beschrieben in *E. coli* ED8767 hergestellt. Der Stamm MH 20 ist vom Wildtyp *C. glutamicum* ATCC13032 abgeleitet und zeichnet sich dadurch aus, daß dessen Aspartatkinase insensitiv gegenüber der feed back Inhibierung durch L-Lysin plus L-Threonin ist (Cremer et al., J General Microbiology 134 (1988) 3221). Cosmide wurden isoliert und der im Aspartatsemialdehyddehydrogenasegen *asd* defekte *E. coli* Stamm RASA51 damit transformiert. Das Transformationsgemisch wurde auf LB-Agar mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und die Platten bei 30 °C inkubiert. Plasmid DNA aus emporgewachsenen Kolonien wurde isoliert, mit dem Restriktionsenzym *BamHI* gespalten, und mit dem ebenfalls *BamHI* gespaltenen und mit alkalischer Phosphatase behandeltem Vektor pJC1 ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurde wiederum der *E. coli* Stamm RASA51 transformiert und auf LB-Agar ausplattiert. Aus einzelnen Kolonien wurde Plasmid DNA präpariert und das Plasmid pJC30 erhalten. Dieses Plasmid wurde durch Restriktionskartierung weiter kartiert. Es enthält eine etwa 8,9 kb lange Insertion chromosomaler DNA. Die Restriktionskarte ist in Figur 3 dargestellt. Von pJC30 wurden verschiedene Subklone in pJC1 hergestellt, mit denen der Wildtyp von *C. glutamicum* transformiert wurde. Von Transformanten wurden Messungen der Aspartatkinase und Aspartatsemialdehyddehydrogenase Aktivität durchgeführt (Figur 3), die zeigen, daß pJC33 die genetische Information für das Aspartatkinaseenzym enthält.

Konstruktion eines *dapA* und *lysC* enthaltend n Vektors pJC50.

Aus dem Vektor pJC30 (gemäß B) wurde das für die deregulierte Aspartatkinase kodierende DNA-

Fragment isoliert. Dazu wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym DraI verdaut und die resultierenden Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt. Das für die Aspartatkinase kodierende, etwa 2,5 kb große DNA-Fragment wurde aus dem Gel wie bei Maniatis et al. beschrieben isoliert und aufgereinigt. Als Vektor wurde pJC23 (gemäß A) benutzt, der bereits das Gen für die Dihydrodipicolinatsynthase trägt. Dieser Vektor wurde mit Pvu2 linearisiert, zur Entfernung der entstehenden Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase behandelt, mit dem isolierten DraI Fragment vermischt, und mit T4-Ligase behandelt. Mit dem Ligationsgemisch erfolgte die Transformation von *Escherichia coli* RDE51. Transformanten davon wurden auf LB-Kanamycinplatten erhalten und von einigen Plasmide isoliert. Neun von zehn Transformanten enthielten das rekombinante Plasmid pJC50, das gleichzeitig die Gene für deregulierte Aspartatkinase und Dihydrodipicolinatsynthase trägt. Eine Restriktionskarte davon wurde erstellt, und ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

Überexpression der Aspartatkinase und Dihydrodipicolinatsynthase Aktivität in rekombinanten *Corynebacterium glutamicum* Stämmen durch pJC50.

Das in *E. coli* konstruierte Plasmid pJC50 wurde mittels Sphäroplastentransformation in den Wildtyp von *Corynebacterium glutamicum* und dessen Derivat DG52-5, das sich durch deregulierte Aspartatkinase Aktivität auszeichnet transformiert. Der Stamm DG-52-5 ist bei Cremer et al. (a. a. O.) beschrieben. Die Aspartatkinase Aktivität und Dihydrodipicolinatsynthase Aktivität wurde in den pJC50 enthaltenen Stämmen bestimmt. Als Kontrollen wurden die Aktivitäten zusätzlich in den Ausgangsstämmen und in den pJC23 (nur Dihydrodipicolinatsynthase) und pJC30 (nur Aspartatkinase) enthaltenen Stämmen gemessen. Die Stämme wurden dazu in einem Komplexmedium, das 2,5 g/l NaCl, 10 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt sowie 2% Glukose (pH7,4) enthielt über Nacht angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, in einem geringen Volumen 100 mM Tris-HG1, 50 mM Ammoniumsulfat (pH8) aufgenommen und mit dem Ultraschallgerät Branson Sonifier aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch hochtourige Zentrifugation bei 15000 g 15 Minuten lang abzentrifugiert und der resultierende Überstand für die Aktivitätsbestimmungen benutzt. Der Aspartatkinase Test und der Dihydrodipicolinatsynthase Test wurden, wie bei Cremer et al. (a. a. O.) beschrieben, durchgeführt. Die zugehörigen Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. ermittelt (Lowry et al., J Biol Chem 193 (1951) 265). Der Gehalt an Enzym, und die Hemmbarkeit der Kinase sind in Tabelle 1 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß hohe Enzymaktivitäten der entscheidenden Enzyme der Lysinbiosynthese sequenz resultieren, und die Aspartatkinase keiner feedback Inhibierung durch L-Lysin plus L-threonin unterliegt.

Beispiel 2:

Ausscheidung von L-Lysin mit Plasmiden die *lysC* und *dapA* in Kombination enthalten.

Die in Beispiel 4 beschriebenen rekombinanten Stämme, sowie die Kontrollen wurden auf dem in Beispiel 4 beschriebenen Komplexmedium angezogen. Nach 17 Stunden Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen geerntet, in 0,9% NaCl resuspendiert, und mit einer Animpfdichte von 1 auf das Fermentationsmedium folgender Zusammensetzung übertragen: 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 g/l KH_2PO_4 , 0,5 g/l K_2HPO_4 , 0,25 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg/l CuSO_4 , 0,02 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg Biotin. Nach dem Autoklavieren wurden 2,4 g Glukose und 1,2 g CaGO_3 zu 60 ml Portionen zugefügt. Die Kolben wurden bei 30 °C auf einem Schüttler bei 140 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Nach 72 Stunden wurden Proben des Kulturfiltrats entnommen, abzentrifugiert, und im klaren Überstand die akkumulierte Menge an gebildetem L-Lysin bestimmt mittels eines Aminosäureanalysators bestimmt. Tabelle 2 zeigt die erhaltenen Werte.

Tabelle 1: Expression der Aspartatkinase und der Dihydrodipicolinatsynthase,
sowie Restaktivität der Aspartatkinase bei Anwesenheit von je 10 mM L-Lysin und
L-Threonin.

Stamm/Plasmid	Sp. Aktivität (U/mg)		
	Dihydrodipicolinat- synthase	Aspartat- kinase	Aspartatkinase + L-Lys, L-Thr
13032	0,20	0,012	0,002
13032/pJC30	0,20	0,220	0,200
13032/pJC23	3,10	0,012	0,001
13032/pJC50	1,95	0,180	0,210
DG52-5	0,21	0,014	0,003
DG52-5/pJC30	0,21	0,240	0,200
DG52-5/pJC23	1,85	0,015	0,003
DG52-5/pJC50	2,05	0,210	0,210

Tabelle 2: Steigerung der Lysinausscheidung durch Kombination zweier Enzymaktivitäten in *Corynebacterium glutamicum*.

5

Stamm/Plasmid	relevantes	Akkumuliertes
	Enzym	L-Lysin (mM)
13032		0
13032/pJC30	Kinase	38
13032/pJC23	Synthase	12
13032/pJC50	Kinase plus Synthase	50
DG52-5		43
DG52-5/pJC30	Kinase	48
DG52-5/pJC23	Synthase	52
DG52-5/pJC50	Kinase plus Synthase	71

20

25

Es zeigen:

30

Fig. 1 : Konstruktion eines lys C_D und dap A tragenden Pendel-
vektors pJC 50 (Bg = Bgl II, C = Cla I, D = Dra I,
E = Eco RI, N = Nae I, P = Pst I, Pv = PVU II,
S = Sal I, Sm = Sma I, Sp = Sph I, Xh = Xho I)

35

Fig. 2 : Deletionsanalyse des dap A/B Clusters aus C. glutamicum
(B = Bam HI, Bg = Bgl II, C = Cla I, H = Hind III,
P = Pst I, Pv = Pvu II, S = Sal I, Sp = Sph I)

40

Fig. 3 Deletionsanalyse des Lys C/asd Operons in *Corynebacterium glutamicum*
(B Bam HI, D Dra I, E EcoRI, N Nae I, P Pst I, S Sal I, X Xho I, Xb Xba I)

45

Ansprüche

50

1. Verfahren zur Herstellung von Aminosäure, insbesondere von L-Lysin, durch Züchten eines Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, der eine rekombinante DNA aus Vektor-DNA und für die Produktion von Proteinen mit dapA-Aktivität kodierende DNA-Sequenz enthält, in einem Nährmedium und Gewinnung der Aminosäure aus dem Kulturmedium, dadurch gekennzeichnet, daß die rekombinante DNA zusätzlich eine für die Produktion von Proteinen mit lysC-Aktivität kodierende DNA-Sequenz enthält.

55

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die kodierenden DNA-Sequenzen aus Stämmen der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium
gewonnen worden sind.
- 5
3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die kodierenden DNA-Sequenzen aus L-Lysin produzierenden Stämmen der Gattung Corynebacte-
rium oder Brévibacterium gewonnen worden sind.
- 10
4. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die DNA-Sequenzen aus einer durch Mutagenese von Corynebacterium glutamicum ATCC 13032
erzielten Mutante mit verminderter Feed back Hemmung der Aspartatkinase erhalten worden sind.
- 15
5. Verfahren nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß die DNA-Sequenzen aus dem Stamm DSM 5714 erhalten worden sind.
- 20
6. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß als transformierter Mikroorganismus der Stamm Corynebacterium glutamicum DSM 5715 einge-
setzt wird.
- 25
7. In Corynebacterium oder Brevibacterium replizierbare rekombinante DNA aus Vektor-DNA und für die
Produktion von Proteinen mit dapA-Aktivität und lysC-Aktivität kodierenden DNA-Sequenzen.
8. Rekombinante DNA nach Anspruch 7,
gekennzeichnet durch
eine Vektor-DNA aus den Plasmiden pZ1, pJC1, pAJ1, pAJ3, pAJ4 und pAJ6 sowie pCG1 oder pCE5.
- 30
9. Mit rekombinanter DNA nach Anspruch 7 oder 8 transformierte, L-Lysin produzierende Mikroorganismen
der Gattung Corynebacterium oder Brevibacterium.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

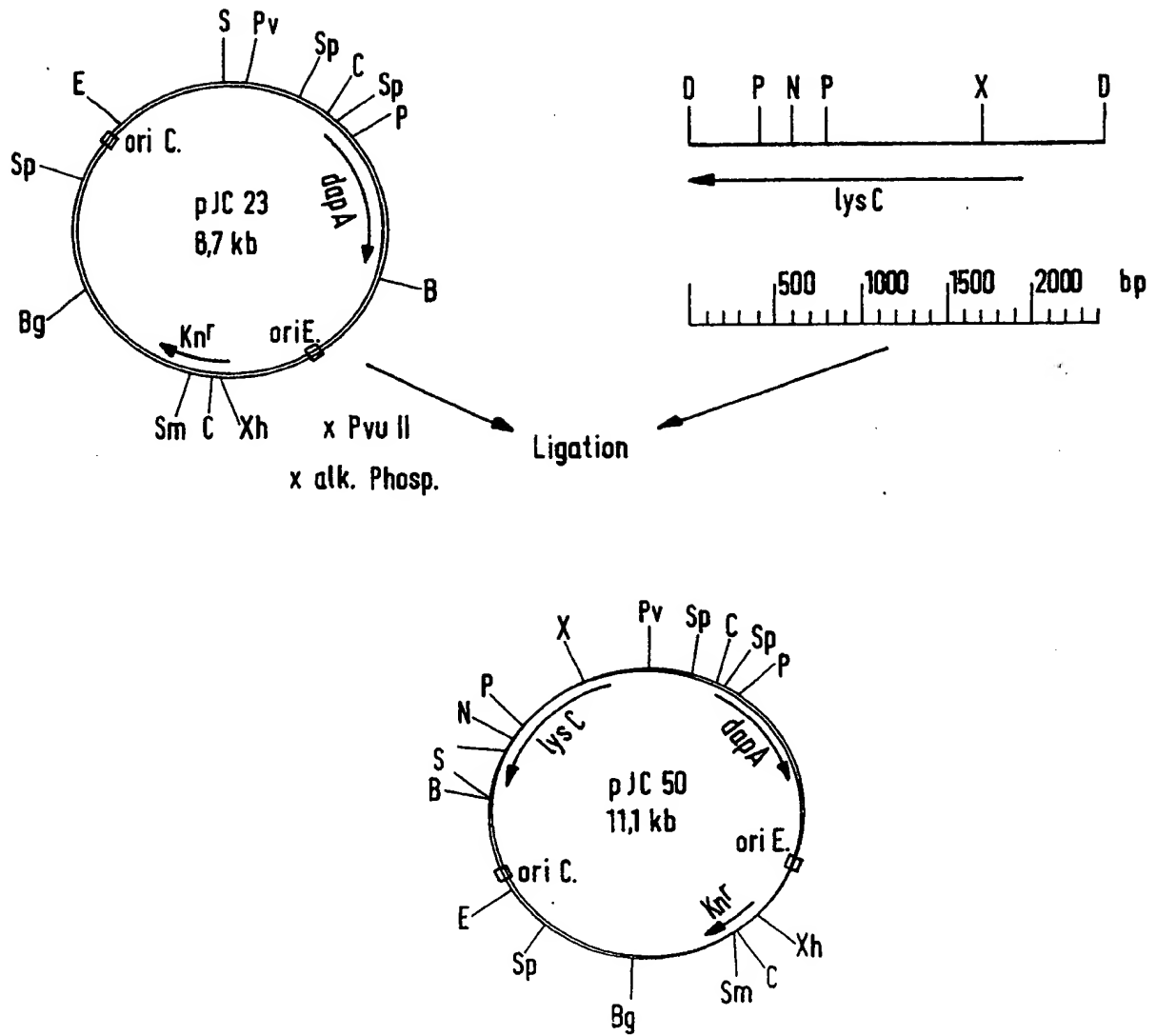


FIG. 1

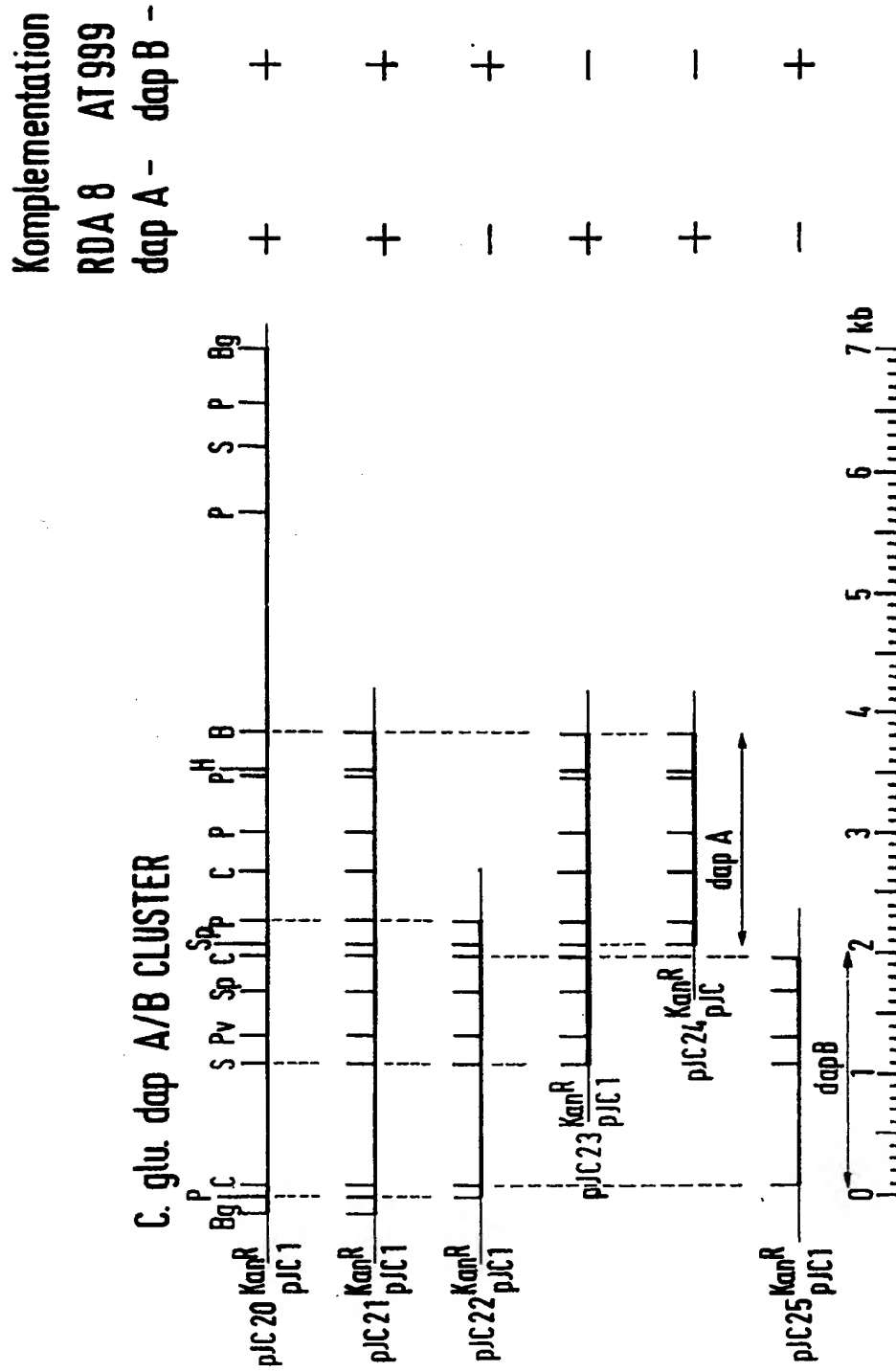
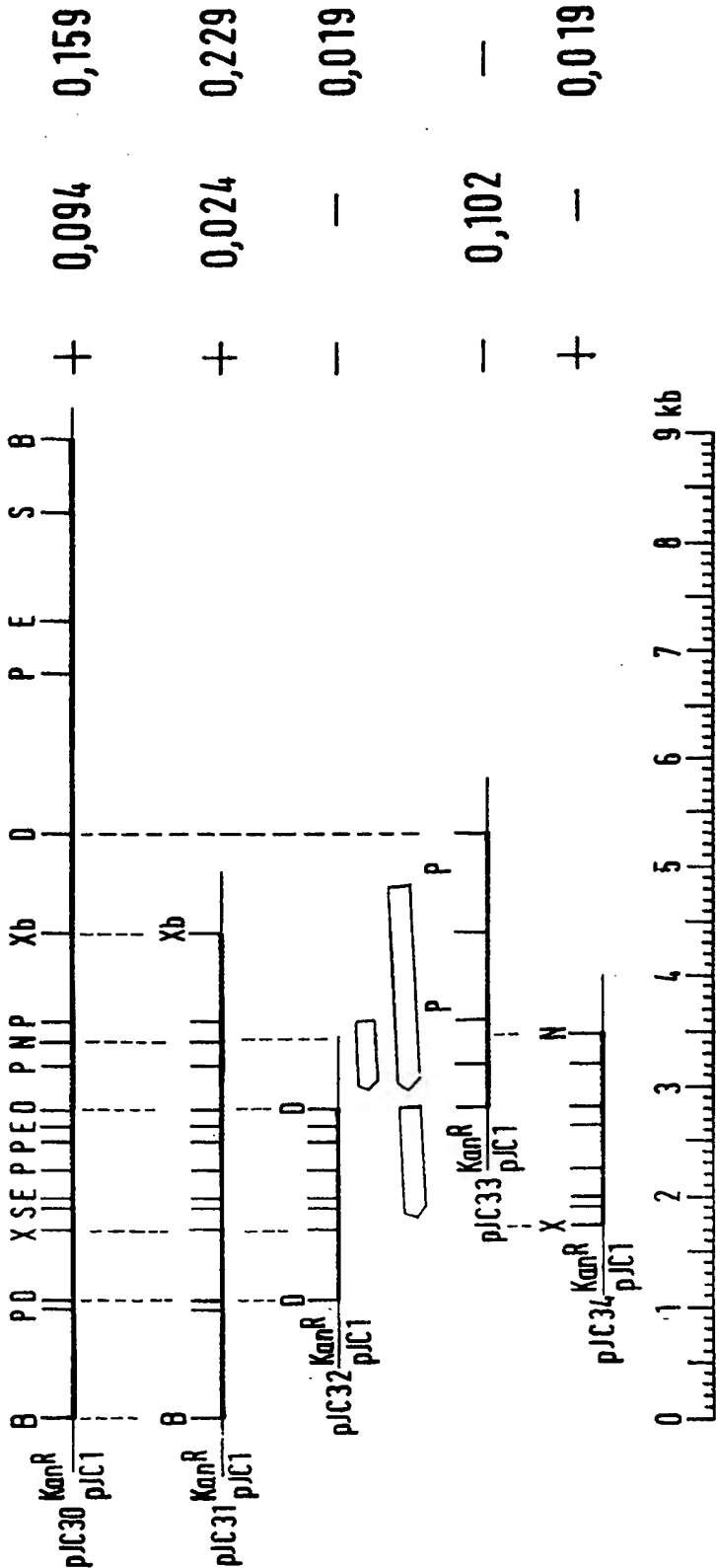


FIG. 2

Komplementation Asp. kin. ASA DH
RASA 51 spez. Akt. spez. Akt.

asd - U/mg U/mg

C. glu. Lys C/asd OPERON



13032 0,014 0,019

FIG. 3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 90124557.1
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.)
D, P, X	EP - A1 - 0 387 527 (DEGUSSA AKTIENGESELLSCHAFT) * Patentansprüche * & DE-A1-3 908 201 --	1-3,7-9	C 12 N 15/09 C 12 P 13/08 C 07 H 21/04 C 12 N 1/21 //(C 12 P 13/08 C 12 R 1:15) (C 12 P 13/08 C 12 R 1:13)
D, P, A	DE - A1 - 3 823 451 (KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GMBH) * Patentansprüche *	1-3,7-9	
D, A	EP - A2 - 0 219 027 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) * Patentansprüche *	1-3,7-9	
D, A	EP - A1 - 0 197 335 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) * Zusammenfassung *	1-3,7-9	
D, A	EP - A1 - 0 143 195 (AJINOMOTO CO., INC.) * Patentansprüche *	1-3,7-9	
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.) C 12 N C 12 P C 07 H
Recherchenort WIEN		Abschlußdatum der Recherche 15-02-1991	Prüfer WOLF
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			